Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 83- 91

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۹۱-۸۳

مقاله علمی- پژوهشی

بررسی اثر روش استخراج با حلال‌های آب و متانول بر ویژگی‌های ضداکسایشی و ضدمیکروبی عصاره گیاه بن‌سرخ: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی "*in vitro*"

محمد حجتی[1*]- بهروز علیزاده بهبهانی[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۶

چکیده

در این پژوهش، عصاره گیاه بن سرخ با استفاده از حلال‌های متانول و آب و به کمک روش ماسراسیون استخراج شد. راندمان استخراج، ترکیبات فنول کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بر پایه مهار رادیکال‌های ۲ و ۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و ۲، ۲- آزینو بیس- ۳ - اتیل بنزو تیازولین- ۶ - سولفونیک اسید (ABTS)) و اثر ضدمیکروبی (بر پایه آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت‌کشندگی) عصاره‌ها با یکدیگر مقایسه گردید. راندمان استخراج و میزان ترکیبات فنولی عصاره متانولی به‌ترتیب ۷/۱۰ درصد و ۸۸/۲۸ mg GAE/g بود در حالی که برای عصاره آبی به‌ترتیب ۴/۶ درصد و ۶۸/۲۹ mg GAE/g بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی (برحسب رادیکال‌های DPPH و ABTS به‌ترتیب ۲/۲۸ mg/mL و ۲/۹۸) به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از عصاره متانولی (برحسب رادیکال‌های DPPH و ABTS به‌ترتیب ۵/۳۳ mg/mL و ۷/۱۲) بود که نشان می‌دهد وجود ترکیبات فنولی تنها عامل مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نمی‌باشد. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد عصاره متانولی برای باکتری‌های *Streptococcus pyogenes*، *Listeria innocua*، *Entrobacter aerogenes*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به‌ترتیب ۴/۶۸، ۴/۶۸، ۷۵، ۱۸/۷۵ و ۱۸/۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در حالی که برای عصاره آبی بن سرخ به ترتیب ۴/۶۸، ۹/۳۷، ۷۵، ۳۷/۵ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میزان حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی برای باکتری‌های *Streptococcus pyogenes*، *Listeria innocua*، *Entrobacter aerogenes*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* به‌ترتیب ۱۸/۷۵، ۱۸/۷۵، ۱۵۰، ۱۵۰ و ۳۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در حالی که برای عصاره آبی بن‌سرخ به‌ترتیب ۳۷/۵، ۳۷/۵، ۳۰۰، ۱۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به نتایج، عصاره گیاه بن سرخ قابلیت استفاده به‌عنوان نگهدارنده طبیعی جهت جلوگیری از اکسیداسیون غذاهای حاوی اسیدهای چرب غیراشباع و همچنین کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیاه بن‌سرخ، عصاره متانولی و آبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، ترکیبات فنولی.

مقدمه

افزایش مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را جهت گسترش گروهی از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی افزایش داده است (Rahman *et al.*, 2009). از سوی دیگر، اکسیداسیون لیپیدهای موجود در مواد خام یا فراوری شده سبب ایجاد طعم نامطلوب و کاهش کیفیت محصولات غذایی می‌شود. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA[3] و BHT[4] با وجود افزایش پایداری محصولات، به دلیل اثرات سمی این ترکیبات نگرانی‌هایی را در رابطه با ایمنی و سلامت محصولات غذایی ایجاد کرده است (Tepe *et al.*, 2005). گیاهان دارویی حاوی طیف وسیعی از ترکیبات فنولی از جمله فنولیک اسیدها، فلاوونوئیدها، تانن‌ها و غیره می‌باشند. وجود این ترکیبات علاوه بر ایجاد خاصیت آنتی‌اکسیدانی که می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد (Pirbalouti, 2019)، دارای اثرات مهارکنندگی و کشندگی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بوده که استفاده از آن‌ها به شدت افزایش داده است (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2017).

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشیار و استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: hojjati@asnrukh.ac.ir)

DOI: 10.22067/ifstrj.v17i1.85992
3 Butylated hydroxyanisole
4 Butylated hydroxytoluene

جنس Allium بزرگ‌ترین و مهم‌ترین جنس خانواده Alliaceae شامل ۷۰۰ گونه می‌باشد که از نظر طعم، رنگ و شکل با یکدیگر تفاوت دارند (Rouis-Soussi *et al*., 2014). این جنس دارای فعالیت ضدباکتری، ضد قارچی و ضدویروس بوده و وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قوی، گوگرد و ترکیبات فنولی متعدد، استفاده از آن را در صنعت غذا افزایش داده است (Pirbalouti, 2019).

گونه *Allium jesdianum* با نام محلی بن سرخ، گیاهی پیازدار و مقاوم بوده که در ارتفاعات مدیترانه و ارتفاعات غرب و جنوب غربی ایران یافت می شود و از گذ شته ا ستفاده از آن در درمان بیماری‌های گوارشی و روماتیسمی مؤثر بوده است (Kalantari *et al*., 2018؛ امیری، ۱۳۸۵). همچنین اثر ضد سرطانی و ضدافسردگی عصاره این گیاه گزارش شده است (Mousavi *et al*., 2017؛ درستی و همکاران، ۱۳۹۶). Naeini و همکاران (۲۰۲۰) عصاره آبی گیاه بن سرخ را تهیه و اثر ضدقارچی آن را بر Candida تایید کردند.

با توجه به بومی بودن گیاه بن سرخ، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی آن و افزایش نگرانی مصرف کننده نسبت به آنتی‌اکسیدان های سنتزی و استفاده بی رویه از آنتی بیوتیک های شیمیایی رایج، هدف از این پژوهش برر سی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه بن‌سرخ بر باکتری‌های *Entrobacter* ،*Listeria innocua* ،*Streptococcus pyogenes* *aerogenes*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه، مواد شیمیایی و محیط کشت‌های میکروبی

گیاه بن‌سرخ از استان کهگیلویه و بویراحمد تهیه و پس از تأیید جنس و گونه آن در دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، گیاه بن‌سرخ جهت تهیه عصاره، در دمای محیط و در سایه به مدت یک هفته خشک و سپس با آسیاب آزمایشگاهی پودر گردید. محیط کشت‌های مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث از شرکت مرک (آلمان)، متانول ۹۶ درصد از شرکت صنایع شیمیایی غدیر (ایران)، و رادیکال DPPH[1]، رادیکال ABTS[2] و معرف تری‌فنل‌تترازولیوم از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری گردیدند.

تهیه عصاره

از روش خیساندن (ماسراسیون) جهت تهیه عصاره‌های آبی و متانولی استفاده گردید. عصاره‌های آبی و متانولی به‌ترتیب با افزودن ۵۰ گرم گیاه پودر شده به ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و متانول ۹۶ درصد تهیه شدند. عصاره متانولی و آبی ۲۴ ساعت در آزمایشگاه نگهداری و هر چند ساعت یک‌بار هم‌زده شد. پس از جمع‌آوری مایع رویی، به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس از فیلتر ۰/۴۵ میکرونی (جهت ا ستریل کردن) عبور داده شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های مختلف در ظروف استریل در بسته نگهداری شدند (علیزاده بهبهانی و همکاران، ۱۳۹۲).

بازده استخراج

پس از توزین لوله خالی، ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های آبی و متانولی به آن اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک و وزن آن‌ها اندازه‌گیری گردید. اختلاف وزن لوله حاوی عصاره و لوله خالی محاسبه و به‌عنوان میزان وزن خشک نمونه گزارش گردید (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵).

اندازه‌گیری میزان فنول کل

میزان فنول کل موجود در نمونه با استفاده از روش Folin–Ciocalteu اندازه‌گیری شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها با ۵ میلی‌لیتر معرف Folin–Ciocalteu (رقت ۱/۱۰) مخلوط گردید. پس از ۵ دقیقه نگهداری، ۴ میلی‌لیتر محلول سدیم‌کربنات (۱ مولار) به مخلوط اضافه و پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری و نتایج بر ا ساس میلی‌گرم گالیک ا سید موجود در هر گرم نمونه خشک شده گزارش شد (Moradi *et al*., 2014).

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و متانولی با استفاده از رادیکال DPPH و بر اساس روش Alizadeh Behbahani و همکاران (۲۰۱۷)، با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه ها با ۳/۹ میلی‌لیتر محلول DPPH (۰/۱۲ میلی‌مولار) مخلوط شد. پس از هم‌زدن نمونه‌ها و نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، جذب آن‌ها در ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت مهارکنندگی}(\%) = (Abs_{control} - Abs_{sample} / Abs_{control}) \times 100 \quad (۱)$$

که در این فرمول، $Abs_{control}$ معادل جذب نمونه کنترل و Abs_{sample} جذب هر یک از ع صاره‌های آبی و متانولی می‌با شد. غلظتی از

1 2, 2-Diphenyl-1- picrylhydrazyl

2 2, 2′-Azino-bis (3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)

عصاره که ۵۰ درصد رادیکال DPPH را مهار می‌کند به‌عنوان مقدار IC_{50} گزارش گردید.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

ابتدا محلول رادیکال کاتیون ABTS ($ABTS^+$) با مخلوط کردن مقادیر یکسانی از محلول‌های ABTS (۰/۷ میلی‌مولار) و پر سولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی‌مولار) و نگهداری به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در تاریکی تولید شد.. سپس محلول $ABTS^+$ با استفاده از متانول تا رسیدن به جذب ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. در ادامه، ۳/۹۰ میلی‌لیتر محلول رقیق شده $ABTS^+$ با ۰/۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها یا متانول (به‌عنوان کنترل) مخلوط و به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر، فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019):

$$\text{فعالیت مهارکنندگی } (\%) = (1- \text{Abs}_{sample} - \text{Abs}_{control})\times 100 \quad (۲)$$

در این فرمول، $\text{Abs}_{control}$ معادل جذب نمونه کنترل و Abs_{sample} جذب عصاره‌های آبی و متانولی می‌باشد. نتایج آزمون رادیکال ABTS بر اساس IC_{50} گزارش گردید.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

باکتری های *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853، *Escherichia coli* ATCC 25922، *Entrobacter aerogenes* ATCC 13048، *Listeria innocua* ATCC 33090 و *Streptococcus pyogenes* ATCC 12344 از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه گردید. هر یک از باکتری‌ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط مولر هینتون آگار و سپس در محیط مولر هینتون براث کشت داده شد. پس از شستشوی محیط کشت با محلول رینگر، استاندارد نیم مک فارلند (CFU/mL^1 ۱۰^۸ × ۱/۵) از سوسپانسیون‌های میکروبی تهیه گردید (حیدری و همکاران، ۱۳۹۸).

آزمون‌های ضدمیکروبی

از ۳ روش دیسک دیفیوژن آگار[2] (DDA)، حداقل غلظت مهارکنندگی[3] (MIC) و حداقل غلظت کشندگی[4] (MBC) جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه بن سرخ استفاده شد.

دیسک دیفیوژن آگار

جهت اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی با استفاده از دیسک دیفیوژن آگار از روش Azhdarzadeh و همکاران (۲۰۱۶) با کمی تغییر استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر باکتری به پلیت‌های حاوی مولر هینتون آگار استریل اضافه گردید. سپس دیسک‌های استریل (قطر ۶ میلی‌متر) آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) روی پلیت‌ها تثبیت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. پس از پایان زمان گرمخانه گذاری، مناطق مهارکننده، با اندازه‌گیری قطر هاله بر اساس میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی

هر یک از عصاره‌های آبی و متانولی جهت رسیدن به غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با محیط مولر هینتون براث مخلوط و رقت‌های متوالی از آن تهیه گردید (۱۵۰، ۷۵، ۳۷/۵، ۱۸/۷۵، ۹/۳۷، ۴/۶۸، ۲/۳۴ و ۱/۱۷). سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی به همراه ۱۵۰ میکرولیتر از رقت‌های تولیدی به پلیت ۹۶ خانه‌ای انتقال داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۱۰ میکرولیتر محلول تری‌فنل‌تترازولیوم ۰/۵ درصد به چاهک‌ها اضافه و مجدداً به مدت ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. اولین غلظتی که در آن رشد باکتری مشاهده نشد (عدم وجود رنگ قرمز) به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید (Noshad *et al*., 2018).

حداقل غلظت‌کشندگی

حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های آبی و متانولی با استفاده از روش پورپلیت تعیین شد. رقتی که در روش حداقل غلظت مهارکنندگی تغییر رنگی مشاهده نشد، بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. غلظتی که در آن هیچگونه کلنی مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش گردید (Alizadeh Behbahani *et al*., 2018، وسیعی و همکاران، ۱۳۹۴).

---

1 Colony forming unit/mL
2 Disc diffusion agar
3 Minimum inhibitory concentration
4 Minimum bactericidal concentration

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نتایج با ا ستفاده از نرم‌افزار SPSS صورت پذیرفت. از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصـــد ($p<0.05$) جهت بررســـی معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

بازده استخراج

میزان بازده اســـتخراج به عوامل مختلفی از جمله نوع حلال، ترکیبات موجود در نمونه، دما و زمان اســـتخراج بســـتگی دارد که در شرایط یکسان حلال مورد استفاده بسیار تأثیرگذار است (Do *et al*., 2014). میزان بازده عصاره‌های آبی و متانولی گیاه بن سرخ به‌ترتیب ۰/۲۸± ۴/۶ درصـــد و ۷/۱±۰/۲۰ درصـــد بود (جدول ۱). بازده بالاتر استخراج با متانول بیانگر این حقیقت است که متانول قادر به استخراج هر دو نوع ترکیبات غیرقطبی و نیمه قطبی بوده در حالی که آب قادر به اســتخراج ترکیبات قطبی می‌باشــد (Alizadeh Behbahani *et al*., 2019). در را ستای نتایج این مطالعه، راندمان بالاتر عصاره‌های الکلی نسبت به عصاره‌های آبی در مطالعات مختلف گزارش شده است (Martinez-Correa *et al*., 2011، وسیعی و همکاران، ۱۳۹۴).

جدول ۱- بازده استخراج، محتوای فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و آبی گیاه بن‌سرخ

عصاره	بازده استخراج (٪)	فنول کل (میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم عصاره خشک)	فعالیت آنتی اکسیدانی (بر حسب IC_{50}؛ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	
			مهار رادیکال DPPH	مهار رادیکال ABTS
متانولی	۷/۱۰±۰/۲۰[a]	۸۸/۲۸±۰/۲۰[a]	۵/۳۳±۰/۸۲[a]	۷/۱۲±۰/۲۹[a]
آبی	۴/۶±۰/۲۸[b]	۶۸/۲۹±۰/۵۲[b]	۲/۲۸±۰/۴۲[b]	۲/۹۸±۰/۵۰[b]

حروف غیرمشابه (a و b) در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

محتوای فنول کل

ترکیبات فنولی در بخش‌های مختلف گیاه وجود دارند که علاوه بر بهبود پایداری غذاهای حاوی چربی، با کاهش بیماری‌های قلبی، می‌توانند اثرات مفیدی بر سلامتی انسان داشته باشند (Pinelo *et al*., 2004). محتوای فنول کل با روش Folin–Ciocalteu که روشی راحت، ساده و قابل تکرار است، تعیین شد. مکانیسم عمل آن شامل احیـای ترکیب مولیبیدن در کمپلکس phosphotungstic- phosphomolybdic به‌عنوان معرف در حضور آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Dutta *et al*., 2012). میزان ترکیبات فنولی به نوع نمونه، حلال و دمای مورد استفاده برای استخراج بستگی دارد (González-Palma *et al*., 2016). در شرایط یکسان، میزان فنول حاصل از عصاره آبی برابر با ۰/۵۲± ۶۸/۲۹ و برای عصاره متانولی برابر با ۰/۲۰± ۸۸/۲۸ میلی‌گرم گالیک اسـید در ۱۰۰ گرم عصـاره خشـک بود (جدول ۱). مقادیر بالای ترکیبات فنولی عصاره متانولی می‌تواند به دلیل استخراج اسیدهای فنولیک غیرقطبی و نیمه قطبی باشد (Thippeswamy *et al*., 2005). این نتایج با یافته‌های حاصل از Rameshkumar و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر میزان بیشـتر فنول موجود در عصاره متانولی در مقایسه با عصاره آبی برگ‌های گیاه *Mollugo nudicaulis* در تطابق می باشـد. همچنین Dailey و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثر حلال‌های مختلف بر میزان فنول کل استخراجی، با تأکید بر اهمیت نوع حلال مورد استفاده، بالاترین مقدار را با استفاده از حلال‌های متانولی و استونی گزارش کردند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

آنتی‌اکســـیدان‌ها در مهار فرایندهای اکســـیداســـیون چربی‌ها و روغن‌ها اهمیت دارند. در سامانه‌های بیولوژیکی، آنتی‌اکسیدان‌ها مانع از شروع و انتشار واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو شده و از این طریق در جلوگیری از بیماری‌های ناشـی از موجودات زنده بسـیار مؤثر می‌باشند (Martinez-Correa *et al*., 2011). در این پژوهش از دو روش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و رادیکال ABST بر اساس IC_{50} جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های متانولی و آبی اسـتفاده گردید. فعالیت آنتی‌اکسـیدانی بر اسـاس IC_{50} رادیکال DPPH عصاره آبی و متانولی به ترتیب برابر با ۰/۴۲± ۲/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۸۲± ۵/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر پایه IC_{50} رادیکال ABST برای عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب برابر با ۰/۵۰± ۲/۹۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۲۹± ۷/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۱). با وجود میزان فنول بالاتر در عصـاره متانولی، عصـاره آبی فعالیت آنتی‌اکسـیدانی بیشتری نسبت به عصاره متانولی نشان داد. گزارش شده است که اگرچه وجود ترکیبات فنولی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر است، اما تنها عامل تعیین‌کننده نمی‌باشـند (Javanmardi *et al*., 2003).

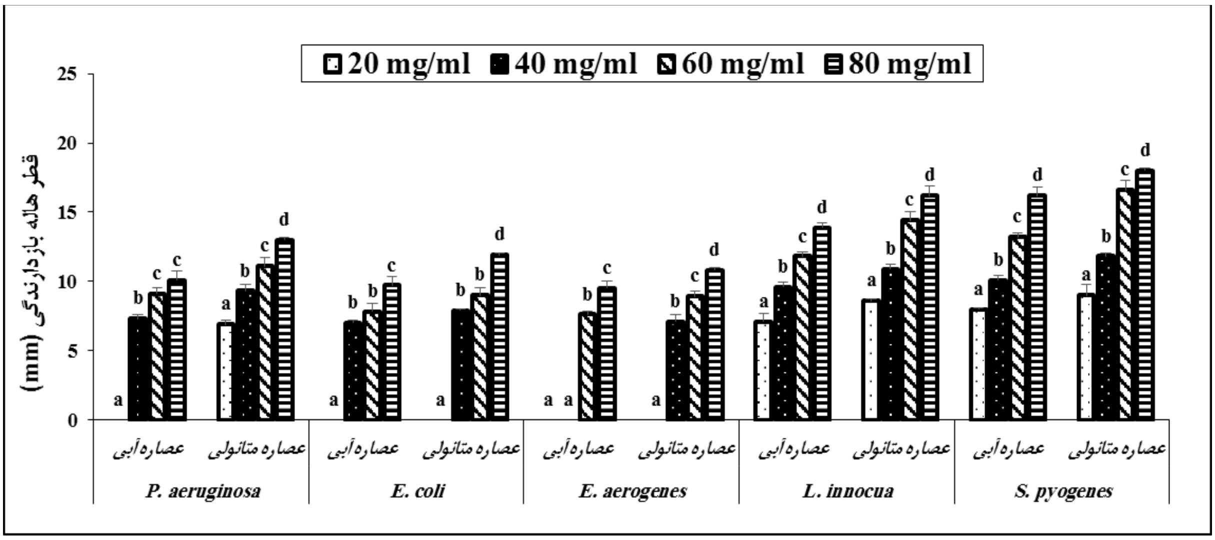
پتانسیل آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در نتیجه وجود سایر مولکول‌ها و اجزای موجود در عصاره باشد که ممکن است توسط روش‌های مذکور اندازه‌گیری نشده باشند (González-Palma *et al*., 2016). همچنین، علاوه‌بر تعداد گروه‌های هیدروکسیل تشکیل‌دهنده ساختار آنتی‌اکسیدان، موقعیت قرارگیری این گروه‌ها، ترکیب گروه‌های کتونی و وجود پیوندهای دوگانه نیز می‌توانند بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر باشند (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۹۵).

فعالیت ضدمیکروبی

عفونت و مسمومیت غذایی ناشی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی یکی از شایع‌ترین علل مرگ‌ومیر در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. با وجود کارایی ترکیبات شیمیایی در پیشگیری و کنترل بیماری‌های ناشی از عفونت و مسمومیت غذایی، استفاده مکرر از این ترکیبات، علاوه‌بر ایجاد مقاومت میکروبی سبب تجمع مواد شیمیایی در زنجیره غذایی می‌شود. این امر منجر به استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله عصاره‌های گیاهی به‌عنوان ماده ضدمیکروبی برای حفظ محصولات غذایی شده است (Mostafa *et al*., 2018). فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و متانولی گیاه بن‌سرخ به روش دیسک دیفیوژن آگار در شکل ۱، نشان شده است. در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی بن‌سرخ بر باکتری‌های *P. aeruginosa*، *E. coli* و *E. aerogenes* و عصاره متانولی بر باکتری‌های *E. coli* و *E. aerogenes* هیچ فعالیت ضدمیکروبی نشان نداد. اگرچه عصاره متانولی در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی باکتری *E. aerogenes* دارای فعالیت ضدمیکروبی بود، اما در عصاره آبی در این غلظت هیچگونه هاله عدم رشد مشاهده نگردید. بالاترین و کمترین قطر هاله عدم رشد در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره‌های آبی و اتانولی، به ترتیب در باکتری‌های *S. pyogenes* و *E. aerogenes* مشاهده شد.

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره بن سرخ در جدول ۲، گزارش شده است. حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های آبی و متانولی برای باکتری *E. aerogenes* برابر با ۷۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای باکتری *S. pyogenes* برابر با ۴/۶۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های متانولی و آبی برای باکتری *E. coli* برابر با ۱۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

اجزای موجود در عصاره‌های گیاهی (ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات فنولی) با آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشای سلولی میکروبی واکنش داده و با ایجاد اختلال در پراکندگی پروتون‌ها به سمت بیرون سلول منجر به مرگ سلولی یا مهار آنزیم‌های مورد نیاز جهت سنتز اسیدهای آمینه می شوند. علاوه بر این، اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی را می‌توان به ویژگی آبگریزی آن‌ها نیز نسبت داد که در نتیجه واکنش با پروتئین‌های غشای سلولی و میتوکندری منجر به تخریب و تغییر در نفوذپذیری آن‌ها می شوند (Mostafa *et al*., 2018). توانایی متانول در استخراج ترکیبات قطبی و غیرقطبی و همچنین خاصیت آبگریزی عصاره‌های گیاهی می‌تواند دلیلی بر فعالیت ضدمیکروبی بیشتر عصاره متانولی در مقایسه با عصاره آبی باشد. در راستای نتایج حاصل از این پژوهش، Faden (۲۰۱۸) از دو حلال آب و متانول جهت استخراج عصاره دانه‌های *Areca catechu* استفاده و بیان کرد که عصاره متانولی دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری‌های *E. coli* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی داشته است.



شکل ۱- قطر هاله بازدارندگی عصاره‌های متانولی و آبی گیاه بن‌سرخ در آزمون دیسک دیفیوژن آگار.

جدول ۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی عصاره متانولی و آبی گیاه بن‌سرخ در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا

عصاره	میکروارگانیسم				
	S. pyogenes	*L. innocua*	*E. aerogenes*	*E. coli*	*P. aeruginosa*
	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)				
متانولی	۴/۶۸	۴/۶۸	۷۵	۱۸/۷۵	۱۸/۷۵
آبی	۴/۶۸	۹/۳۷	۷۵	۳۷/۵	۳۷/۵
	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)				
متانولی	۱۸/۷۵	۱۸/۷۵	۱۵۰	۱۵۰	۳۷/۵
آبی	۳۷/۵	۳۷/۵	۳۰۰	۱۵۰	۷۵

همچنین Karaman و همکاران (۲۰۰۳)، در بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره آبی و متانولی *Juniperus oxycedrus* با استفاده از روش دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی، بیان کردند که عصاره متانولی بر باکتری‌های مورد بررسی اثر ضدمیکروبی بیشتر داشته است. نتایج آزمون‌های دیسک دیفیوژن آگار، حداقل غلظت کشندگی و حداقل غلظت مهارکنندگی نشان دهنده مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی از جمله *E. coli* و *E. aerogenes* نسبت به باکتری‌های گرم مثبت مانند *S. pyogenes* در برابر عصاره‌های آبی و متانولی می‌باشد. مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به ساختار دیواره سلولی آن‌ها نسبت داد. باکتری‌های گرم منفی دارای یک سد نفوذ ناپذیری مؤثر می‌باشند که از یک غشای بیرونی لیپوپلی ساکارید تشکیل شده است که قابلیت محدود سازی نفوذ عصاره گیاه به داخل سلول را دارا می‌باشد؛ در حالیکه باکتری‌های گرم مثبت دارای یک لایه پپتیدوگلیکان شبیه به مش با خاصیت نفوذپذیری بیشتری می‌باشند (Biswas *et al*., 2013).

نتیجه‌گیری

حضور ترکیبات زیست فعال با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی در عصاره گیاه بن سرخ در این مطالعه نشان داده شد. محتوای فنول کل عصاره متانولی بیشتر از عصاره آبی بود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره‌های آبی و متانولی بیانگر کاربرد بالقوه عصاره گیاه بن‌سرخ به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت بهبود پایداری اکسایشی مواد غذایی و روغن‌های غیرا شباع می‌باشد. عصاره گیاه بن سرخ، به‌ویژه عصاره متانولی، سبب جلوگیری از رشد و همچنین از بین بردن میکروارگانیسم‌های مولد فساد و پاتوژن گردید. بنابراین از عصاره زیست فعال گیاه بن سرخ می‌توان به‌عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی و جایگزین آنتی‌بیوتیک های شیمیایی برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مضر، درمان بیماری‌های عفونی و افزایش ایمنی محصولات غذایی استفاده کرد.

قدردانی و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۹۸۱/۵۲ می‌باشد و نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت انجام این طرح تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, MH., Fasihi-Ramandi, M., Namdar, N., Abdollahi, S., Mousavi, SM., SamiZadeh, B., Allahverdi, GH., 2016. Surveying the effect of the phenol compounds on antibacterial activity of herbal extracts: In vitro assessment of herbal extracts in Fasa-Fars Province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, *6:* 210-220.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F., 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*, *136*, 103716.

Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Falah, F., 2019. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, *13*(1), 875-883.

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M., 2017. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *11*(2), 847-863.

Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M., 2017. Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, *94*, 515-526.

Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., Mohebbi, M., 2014. Antifungal Effect of Aqueous and Methanolic *Avicennia Marina* Leaves Extracts on *Alternaria Alternata* and *Penicillium Citrinum. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences, 12 (2),* 1015-1024. [In Persian].

Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Shahidi, F., Noorbakhsh, H., Vasiee, A., & Alghooneh, A., 2018. Phytochemical analysis and antibacterial activities extracts of mangrove leaf against the growth of some pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, *114*, 225-232.

Amiri, H. (2007). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Allium jesdianum* Boiss. & Buhse from Iran. *Journal of Medicinal Plants, 1 (S3)*:39-44.

Azhdarzadeh, F., & Hojjati, M., 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, *3*(1), 43-50.

Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., & Yadav, A., 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*, *2013*, 1-7.

Dailey, A., & Vuong, Q. V., 2015. Effect of extraction solvents on recovery of bioactive compounds and antioxidant properties from macadamia (*Macadamia tetraphylla*) skin waste. *Cogent Food & Agriculture*, *1(1)*, 1115646.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. E., Ismadji, S., & Ju, Y. H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. *Journal of Food and Drug Analysis*, *22(3)*, 296-302.

Dorosti, N., Zarabi, S., Ahmadi, Sh., Rostami, R., Rashidi Pour, M., 2017. Anticancer activity evaluation of methanolic extract of *Allium Jesdianum* and *Nectaroscordeum coelzi* against HeLa and K562 cell lines. *Yafteh*, *19(1)*, 31-41.

Dutta, A. K., Gope, P. S., Makhnoon, S., Rahman, S., Siddiquee, M. A., & Kabir, Y. 2012. Effect of solvent extraction on phenolic content, antioxidant and α-amylase inhibition activities of Swertia chirata. *International Journal of Drug Development and Research*, *4*, 317-325.

Faden, A. A. (2018). Evaluation of antibacterial activities of aqueous and methanolic extracts of areca catechu against some opportunistic oral bacteria. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *15*(3), 655-659.

González-Palma, I., Escalona-Buendía, H. B., Ponce-Alquicira, E., Téllez-Téllez, M., Gupta, V. K., Díaz-Godínez, G., & Soriano-Santos, J., 2016. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of Pleurotus ostreatus in different growth stages. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1099.

Heydari, S., Jooyandeh, H., Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., 2019. Invitro determination of chemical Compounds and antibacterial activity of Lavandula essential oil against some Pathogenic microorganisms. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*, *27 (4)*, 77-89. [In Persian].

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M., 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry*, *83*(4), 547-550.

Kalantari, H., Shamsi Ehsan, T., Samimi, A., Kheradmand, P., & Shirani, M., 2018. Histopathological and biomedical parameters determination in the protective effect of hydroalcoholic extract of *Allium jesdianum* on hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *14*(2), 15-24.

Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Öğütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, *85*(2-3), 231-235.

Martinez-Correa, H. A., Magalhães, P. M., Queiroga, C. L., Peixoto, C. A., Oliveira, A. L., & Cabral, F. A., 2011. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, *55*(3), 998-1006.

Moradi, S., Razavi, S. H., & Vasiee, A., 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* L. on some pathogenic bacteria '*in vitro*'. *Agricultural Advances*, *3*(4), 124-130.

Mostafa, A. A., Al-Askar, A. A., Almaary, K. S., Dawoud, T. M., Sholkamy, E. N., & Bakri, M. M., 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *25*(2), 361-366.

Mousavi, R., Fashi, Z. H., Jahromy, M. H., & Rasooli, R., 2017. Potential of the Allium jesdianum Extract in Suppression of Anxiety and Depression in Mice. *British Biomedical Bulletin*, *5*, 302-307.

Naeini, A., Yaraee, R., & Shokri, H., 2020. Antifungal and immunomodulatory activity of *Allium jesdianum* Boiss extracts. *Journal of Herbmed Pharmacology*, *9*(1).

Noshad, M., Hojjati, M., & Alizadeh Behbahani, B. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*, *116*, 153-157.

Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C., 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *88*(2), 201-207.

Pirbalouti, A. G., 2019. Phytochemical and bioactivity diversity in the extract from bulbs and leaves of different populations of *Allium jesdianum*, a valuable underutilized vegetable." *ACTA Scientiarum polonorum-Hortorum cultus*, *18*(2), 115-122.

Rahman, A., & Kang, S. C., 2009. In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. *Food Chemistry*, *116*(3), 670-675.

Rameshkumar, A., & Sivasudha, T., 2012. In vitro antioxidant and antibacterial activity of aqueous and methanolic extract of *Mollugo nudicaulis* Lam. leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(2), S895-S900.

Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh Behbahani, B., Vasiee, A., Roshanak, S., Mortazavi. A., 2017. Production of an antimicrobial edible coating based on *Plantago major* seed mucilage in combination with *Heracleum persicum* essential oil: its properties and application in beef. *Applied Microbiology in Food Industries*, *3(3)*, 1- 21. [In Persian].

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M., 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, *90*(3), 333-340.

Thippeswamy, N. B., & Naidu, K. A., 2005. Antioxidant potency of cumin varieties-cumin, black cumin and bitter cumin-on antioxidant systems. *European Food Research and Technology*, *220*(5-6), 472-476.

Vasiee, A., Tabatabaei, Y.F., & Mortazavi, S.A., 2016. The antibacterial activity of coriander (*coriandeum sativum*) on pathogenic microorganisms "in vitro". *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine, 20(71),* 59-66. [In Persian].

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 1, Apr. May. 2021, p. 83- 91

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۰ ص.۹۱-۸۳

Evaluation of the effect of aqueous and methanolic extraction methods on the antioxidant and antimicrobial characteristics of *Allium jesdianum* extract: *in vitro* study

M. Hojjati[1*], B. Alizadeh Behbahani[2]

Received: 2020.03.13
Accepted: 2020.04.25

Introduction: There is a remarkable interest in developing natural antimicrobial compounds of essential oils and plant extracts origin, due to the increase of bacterial resistance to common antibiotics. On the other hand, lipid oxidation in raw or processed materials leads to food rancidity and deterioration. In this way, synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) are used to prolong the storage stability of food products. Nevertheless, the toxicologists and nutritionists have documented the side effects and potential toxic effects of synthetic antioxidants. Herbs contain a wide variety of phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoid, tannins and so forth. These bioactive compounds could be therefore used as natural antioxidants and antimicrobial agents to suppress lipid oxidation and food spoilage. In this context, *Allium jesdianum* extracts were obtained and their antioxidant and antimicrobial activities were investigated.

Materials and methods: *A. jesdianum* was exposed to methanolic and aqueous maceration-based extraction methods to extract its bioactive compounds with positive biological activity. The extraction yield, total phenolic compounds, antioxidant activity (based on DPPH and ABTS radical scavenging activity), and antimicrobial activity (based on disc diffusion agar, minimum inhibitory concentration, and minimum bactericidal concentration methods) of the methanolic and aqueous extracts were evaluated and compared to each otherr.

Results and discussion: The methanolic extract of *A. jesdianum* had higher extraction yield of 7.1±0.2% compared to the aqueous extract with 4.6±0.28% extraction yield, mainly due to the ability of methanol to extract both nonpolar and semi-polar compounds. The total phenolic compounds of the methanolic extract were also remarkably higher than the aqueous counterpart (88.28% *vs.* 68.29% mg gallic acid/g dried extract), indicating that the solvent type plays a significant role in extracting bioactive compounds. However, the aqueous extract was able to significantly scavenge DPPH and ABTS radicals compared to the methanolic extract. This means that the presence of phenolic compounds is not the only factor affecting the antioxidant activity of plant extracts. The bioactive extracts of *A. jesdianum* were able to suppress the growth of or kill the examined bacteria *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. aerogenes*, *L. innocua*, and *S. pyogenes*; and this effect was more pronounced in the methanolic extract. Therefore, *A. jesdianum* methanolic and aqueous extracts could be used as natural preservatives to improve the oxidative stability of food products rich in unsaturated fatty acids, and to inhibit the growth of spoilage and pathogenic microorganisms, treat infections, and increase the safety of food products.

Keywords: *Allium jesdianum*, Methanolic and aqueous extract, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, Phenolic compounds.

1, 2. Associate Professor and Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
(*Corresponding author's email: hojjati@asnrukh.ac.ir)